Betrachtungen und Untersuchungen über die Nekrobiose und die letale Chloroformeinwirkung

von

Th. WEEVERS.

Mit 1 Textfigur.

§ 1. EINLEITUNG.

Den Begriff der Nekrobiose im Gegensatz zu dem der Nekrose fasst Beyerinck [1]) derart, dass bei Nekrose die Enzyme gleichzeitig mit dem Tode des Protoplasmas zerstört werden, bei Nekrobiose zwar das Protoplasma stirbt, jedoch die Enzyme tätig bleiben. In seiner Arbeit wird schon erwähnt, dass bei vielen Pflanzen die Nekrobiose Veranlassung gibt zur Pigmentbildung oder zur Produktion von aromatischen Stoffen und ätherischen Ölen; für ersteren Fall nennt er als Beispiele *Pirus communis* L., *Trollius, Aconitum, Salix* und *Populus*, für letzteren Fall *Cruciferae, Amygdaleae, Spiraea* und *Asperula*.

Speziell in Bezug auf ersteren Fall will ich unten

1) Beyerinck M. W. Meded. kon. Akad. v. Wet. A'dam 1900. Unter Nekrobiose werden von Verworn (Allgemeine Physiologie) mit Erweiterung eines von Virchow in die Pathologie eingeführten Begriffs, diejenige Prozesse verstanden, die mit einer unheilbaren Schädigung des normalen Lebens beginnend, schneller oder langsamer zum unvermeidlichen Tode führen.

einige Beobachtungen mitteilen, jedoch zuvor etwas genauer auf die Tatsache der Nekrobiose selbst und die letale Einwirkung des Chloroformdampfes eingehen.

Wir wissen, dass zahlreiche Pflanzen zwar Enzyme und Glykoside enthalten, jedoch so lange die Gewebe lebendig sind, keine Einwirkung beider Stoffe auf einander zu beobachten ist. Sowie ich schon früher hervorhob, liegt dann die Voraussetzung auf der Hand, dass eine räumliche Trennung vorliegt, die beim Tode durch den Verlust der Semipermeabilität aufgehoben wird, [1]) es sei denn, dass beide Stoffe in denselben oder in verschiedenen Zellen vorhanden sind. Beyerinck fand das Enzym der *Isatis tinctoria* L. in den Chloroplasten, das Isatan, das vom Enzym gespaltet werden kann im Protoplasten, für *Salix purpurea* L. habe ich [2]) die wahrscheinliche Anwesenheit von Chromogen und Enzym in denselben Zellen ebenfalls betont. Die Lokalisation in verschiedenen Zellen konstatierte z. B. Guignard [3]) bei *Cruciferis* und bei mehreren *Rosaceen*.

Es versteht sich, dass allerhande Ursachen, die Nekrobiose hervorrufen können, bringt man z. B. die Blätter von *Vaccinium vitis idaea* L. und *Pirus communis* L. in ein Wasserbad von $\pm$ 55° C. so sterben die Teile ab, das Enzym wird jedoch nicht zerstört. [4]) Dasselbe ist der Fall

---

1) **Weevers Th. Jahrb. f. wiss. Botanik Bd. 39. 1903.**
Für die Annahme Palladins, dass speziell nach dem Absterben der Pflanzen, die Tätigkeit der analysierenden und oxydierenden Fermente, die der synthesierenden und reduzierenden Enzyme übertrifft, kann ich keine zwingenden Gründe anerkennen und in unsrem Falle würde diese Annahme überdies bei der Lokalisation in verschiedenen Zellen schwerlich eine Erklärung der Tatsachen geben können.
Obenstehendes ist in Uebereinstimmung mit der Meinung Hofmeisters (Naturw. Rundschau 1901), obschon damit nicht gesagt ist, dass ich mit der Hypothese der chemischen Organisation der Zelle im Wabensystem des Protoplasmas völlig einverstanden bin.
2) **Weevers Th. l. c.**
3) **Guignard L. C. Rendus T. 111.**
4) **Vergleiche diese Zeitschrift Vol. VII 1910.**

beim Töten der Teile durch niedrige Temperatur oder durch die Einwirkung verschiedener Gifte.

Czapek[1]) hat über letzteren Gegenstand eingehende Untersuchungen angestellt, insbesondere über die Exosmose aus durch Gifte geschädigten Pflanzenzellen. Dazu benutzte er die sehr empfindliche Reaktion der Gerbstoffausfällung mittelst Ammonia- oder Koffeinlösung. Er sagt: „das Ausbleiben der Fällung nach Behandlung der Zellen (*Echeveria*) mit Säuren bis zur Grenze $^{N}/_{6400}$ ist sicher verursacht durch Exosmose und Verdünnung des Zellinhaltes nach Störung der normalen Semipermeabilität der Plasmahaut."

Bei sorgfältiger Prüfung Czapeks Versuchsprotokolle komme ich zu der Folgerung, dass meistenfalls diese Exosmose eben beim Tode der Zellen eintritt, das Verschwinden der Gerbstoffreaktion in den Zellen später, weil zur völligen Exosmose natürlich einige Zeit erfordert wird. Mit der Exosmose wird die Aufrechterhaltung des Turgors unmöglich und die Teile werden schlaff.

Kahlenberg und True,[2]) welche die Giftwirkung von Säuren auf Pflanzenzellen schon früher studierten, benutzten dabei als Grenzwert die eben erfolgende Hemmung des Längenwachstums von Lupinenwurzeln und fanden dabei ebenfalls bei allen stark elektrolytisch dissoziierten Säuren eine Schwelle bei $^{N}/_{6400}$.

Obschon bei noch grösseren Verdünnungen natürlich bereits Schädigung vorkommen kann, ist also eine Verdünnung von $^{N}/_{6400}$ bei den starken Säuren als der Grenzwert zu betrachten, bei welchem für mehrere Objekte

1) Czapek F. Versuche über Exosmose aus Pflanzenzellen. Ber. d. d. bot. Ges. 1910 und Über eine Methode zur direkten Bestimmung der Oberflächespannung der Plasmahaut von Pflanzenzellen. 1911.

2) Kahlenberg L. und True R. H. Botan. Gazette 1896.

und mit mehreren Methoden der Tod der Zellen mit Durchlässigkeit der Plasmahaut zu konstatieren ist.[1]

In Übereinstimmung mit Obenstehendem nennt Pfeffer (Pflanzenphysiologie II S. 288 2e Aufl.) Erschlaffung, Verfärbung, Austrocknen, die alle auf dem Schwinden der Semipermeabilität beruhen, Folge und Symptome der Tötung und sagt: „nötigenfalls kann durch die Nichtplasmolysierbarkeit, durch die Färbbarkeit des Protoplasmas durch Anilinblau, durch den Austritt der im Zellsaft gelösten Farbstoffe entschieden werden ob der Protoplast lebendig oder tot ist."

Dabei stützt Pfeffer sich auf die bahnbrechenden Arbeiten von Sachs[2] und Hugo de Vries[3] auf diesem Gebiete. Dem Aussehen des toten Protoplasten will Pfeffer keine grosse Bedeutung zuschreiben, weil je nach der Art der Tötung die Deformation sehr verschieden sein kann.

Fast jedes Kriterium für den Tod der Zellen beruht also in letzter Instanz auf dem Schwinden der Semipermeabilität, wobei, wahrscheinlich irreversible Änderung der

1) Selbstverständlich können dabei spezifische Eigentümlichkeiten vorherrschen und hat der Wert $^{N}/_{6400}$ nicht für jedes Objekt Gültigkeit. So fand schon F. D. Heald (Bot. Gaz. 1896), der auf Veranlassung von Kahlenberg obenstehende Untersuchungen mit andern Objekten wiederholte, für *Zea Mais* Keimwurzeln einen Grenzwert $^{N}/_{1600}$ und beobachtete G. J. Stracke (Archiv. Neerl. Serie II T. X 1905), dass HCl $^{N}/_{100}$ für die oxalsäurereiche Zellen der Blattschuppen von *Begonia manicata* Cels. unschädlich ist.

Die von A. J. Brown (Proc. Royal Soc. of London 1909) beobachtete Semipermeabilität der Zellschicht der *Hordeum* Samen, hat mit Protoplasmawirksamkeit nichts zu schaffen.

2) Sachs J. Flora 1864.

3) Hugo de Vries. Sur la mort des cellules végétales par l'effet d'une température élevée; Archiv. Neerl. 1871 T. VI.

Plasmakolloïden auftritt und damit das dynamische Gleichgewicht, das den Lebensprozess charakterisiert unwiderruflich zerstört wird. [Vergl. dazu auch die Arbeiten von E. Verschaffelt[1] und Stracke.[2])]

Statt von dem Schwinden der Semipermeabilität ist es besser von dem Schwinden der relativen Impermeabilität zu sprechen, denn sowie von vornherein schon deutlich ist, kann nicht von einer absoluten Semipermeabilität[3]) die Rede sein, weil Nahrungsstoffe permeieren müssen.

Die neueren Arbeiten von Overton, Ruhland, Nathansohn u. a. haben diese Tatsache des Permeierens überzeugend klargelegt; auf den noch streitigen Punkt wie die Aufnahme der verschiedenen Stoffe stattfinden kann und auf die damit zusammenhängende Frage nach dem Bau der Protoplasmahautschicht will ich hier nicht eingehen.

Ebenfalls hat es sich ergeben, dass die Permeabilität durch äussere Einflüsse weitgehend modifiziert werden kann.

Schon in 1872 hat Hugo de Vries[4]) gezeigt, dass durch die Einwirkung einer sehr verdünnten (0,04 %) H_3N Lösung, das sonst für NaCl und KNO_3 impermeabele Protoplasma von *Tradescantia* permeabel wird, jedoch keine Exosmose des Anthocyans stattfindet. Dieser Autor hob ebenfalls hervor, dass bei der Einwirkung mehrerer Stoffe die Hautschicht getötet wird, die Vakuolenwandung jedoch ihre relative Impermeabilität behält. Wird letztere ebenfalls völlig permeabel, so ist der Tod unabweisbar. Bei einem schnell wirkenden Gifte wie Chloroformdampf ist

1) Verschaffelt E. Bepaling der werking van vergiften op planten. Meded. kon. Ak. v. Wetenschappen A'dam 1904.

2) Stracke G. J. Recherches sur l'immunité des plantes supérieures pour leur propre poison. Archiv. Neerl. Série II T. X 1905.

3) Semipermeabel nennt man ja diejenige Membranen, die nur das Lösungsmittel, keine gelösten Stoffe permeieren lassen.

4) H. de Vries. Pringsheims Jahrb. XVI 1885.

diese Tatsache und das allmählich für verschiedene Stoffe permeabel werden beim Tode fast nicht nachzuweisen, sowie ich unten zeigen werde.

Lepeschkin [1]) konstatierte bei den Gelenkpolstern von *Phaseolus* und *Mimosa*, bei *Tradescantia discolor* und *Spirogyra*, dass nach Verdunklung die Permeabilität abnimmt, Tröndle [2]) konnte zeigen, dass diese Änderung eine typische Reizreaktion ist, die in narkotisiertem Zustande nicht eintritt. Das Austreten von Mineralstoffen $CaCl_2$, KCl, KNO_3, $CaSO_4$, aus dem Zellsaft beobachtete ersterer bei den Gelenkzellen; es exosmierte jedoch nur ein Teil der Inhaltstoffe, sodass von einem Schwinden der relativen Impermeabilität nicht die Rede war. Ebenfalls beobachtete Szücs [3]) eine Modifiziering der Permeabilität durch Elektrolyte und wies Flury [4]) nach, dass die Hautschicht der Spirogyrazellen und einiger Wurzelhaare durch die Einwirkung sehr verdünnter Aluminiumsulfatlösung für KNO_3, Na_2SO_4, H_4NCl, $(H_4N)_2$ SO_4, Kaliumacetat, Kaliumtartrat, Glyzerin, Saccharose und Glukose permeabel wird. Die beobachtete Entstärkung der Zellen liess sich am besten durch Exosmose der Zucker [5]) erklären. Jedoch behielten

1) **Lepeschkin. W. W. Ber. d. d. bot. Ges. 1908; Beih. Bot. Centralbl. Bd. 24 1e Abt. 1909.**

2) Tröndle. Jahrb. f. wiss. Bot. 1910.

3) Szücs J. Sitz. ber. d. k. Akad. d. Wiss. Wien 1910.

4) Flury M. Flora 1909.

Bei gut abgewaschenen Schnitten aus dem roten Zellparenchym der Rübe fand ich in Uebereinstimmung mit Ruhland (Jahrb. f. wiss. Botanik 1911) und im Gegensatz zu Puriewitsch nur sehr geringe Exosmose der Invertzucker und keine des Rohrzuckers. Es gelang mir nicht durch Aluminiumsulfatlösungen verschiedener Stärke (ich prüfte von 0,01 % bis 2 %, stärkere haben bald letale Wirkung) eine Steigerung der Exosmose der Kohlehydrate hervor zu rufen.

5) Schon früher hatten Puriewitsch (Ber. d. d. bot. Ges. 1896) und Hansteen (Flora 1894) die Exosmose von Kohlehydraten aus Endospermgewebe beobachtet. Durch Chloroformieren wird dies zwar verhindert, aber das ist eine Reiz- nicht eine letale Wirkung.

die Zellen ihre Turgeszenz, die relative Impermeabilität des Protoplasmas war also erhalten geblieben und bei mehrtägigem Verweilen in Wasser und einigen Salzlösungen wurde die frühere Impermeabilität wieder hergestellt.

Der oben ausgesprochene Satz, dass das Schwinden der relativen Impermeabilität, der Verlust des dynamischen Gleichgewichtes, ein Kriterium des Todes ist, wird deshalb durch diese neueren Ergebnisse durchaus nicht angefochten; man kann jedoch nicht mehr sagen, dass die Exosmose eines Teiles der Inhaltstoffe beim Leben unmöglich ist. Es wäre also ganz gut denkbar, das ebensowie Kohlehydrate bei der Wirkung bestimmter äusserer Einflüsse durch die lebendige Plasmahaut exosmieren und intrameieren können, ebenfalls dies für Glykoside zutreffen würde. In diesem Falle könnte schon beim Leben, die räumliche Trennung von Enzym und Glykosid aufgehoben werden und Spaltung letzteres auftreten, die Grenze zwischen Nekrobiose und Leben würde sich dann verwischen.

Im Jahre 1909 erschienen zwei Arbeiten von Guignard [1] und Mirande [2], die sich beide auf die Spaltung von Glykosiden unterm Einfluss gewisser Anästhetica und des Frostes beziehen. In sofern bei diesen Untersuchungen von Nekrobiose die Rede ist, die Gewebe also tot sind, wenn die Spaltungsprodukte sich bilden, vertiefen diese Arbeiten unsre Einsicht nicht und haben lediglich den Wert [3] einer Ausarbeitung der obengenannten Schrift Beyerincks, denn sowie ich oben auseinandersetzte wird beim Tode das Protoplasma völlig permeabel und wird deshalb die Trennung der Enzyme und Glykoside

1) **Guignard** L. C. Rendus 1909. S. 91.
2) **Mirande** M. C. Rendus 1909. S. 140.
3) Die Arbeit hat jedoch Wert zum Nachweis der HCN liefernden Pflanzen.

aufgehoben. Letztere können also gespaltet werden, wenn sie in die Enzym enthaltenden Zellen eingedrungen sind; vielleicht diffundieren dann ebenfalls die gelösten Enzyme.

Tritt jedoch dieses Permeieren und die nachfolgende Glykosidspaltung schon beim Leben auf? Das ist hier die Frage.

In der Arbeit von Guignard ist davon nicht die Rede und das Austreten von Flüssigkeit aus den Geweben, das schlaff werden der Teile, der Farbwechsel machen es fast sicher, dass die Teile nicht mehr lebendig waren, als die Glykosidspaltung erfolgte. Mirande sagt jedoch: „on peut ménager l'action du chloroforme de manière à conserver la feuille vivante après l'expérience."

Dieser Satz bezieht sich auf den Nachweis der Blausäure [1]) in den Blättern von *Prunus laurocerasus* L. mittelst des Reagens von Guignard. Löschpapier, das zuerst mit mit einer 1 % Pikrinsäurelösung und später mit einer 10 % Na_2 CO_3 Lösung getränkt ist, sodass die Farbe gelb wird, gibt mit Spuren Blausäure eine rote Färbung, die sich auf die Bildung der Isopurpursäure gründet.

Später haben H. E. Armstrong und E. F. Armstong [2]) behauptet, dass die Einwirkung von Chloroform und von andern Anästhetica, die sie mit dem Namen von Hormonen [3]) bezeichnen. speziell eine Stimulierung der Enzymtätigkeit verursacht. Mit Nachdruck bekämpfen sie die von Waller [4])

---

1) Nach Herissey C. R. 1905 enthalten die Blätter Prulaurasin, das durch Enzymspaltung Blausäure liefert.

2) Armstrong H. E. und E. F. Proc. royal. Soc. 1910. Annals of Botany 1911.

3) H. Starling hat das Wort zuerst in der Physiologie des Menschen für chemische Reizstoffe benutzt. 78. Vers. d. Naturf. und Ärzte 1906.

4) Waller, A. D. Proc. royal. Soc. 1910.

ausgesprochene Meinung, dass die von ihnen studierten Prozesse lediglich Todesphänomene sein würden.

Es schien mir deshalb der Mühe wert, dies einmal nachzuprüfen und im allgemeinen die Einwirkung von Chloroformdampf auf die Pflanze speziell mit Berücksichtigung von dem Eintreten des Todes zu studieren.

---

§ 2. Die letale Einwirkung von Chloroformdampf bei konstanter Temperatur und Tension.

Bei den Arbeiten von Guignard und Mirande wurde der Chloroform als Dampf angewandt, ich habe daher bei meinen Untersuchungen dies ebenfalls getan und die Pflanzen während einiger Zeit unter eine Glasglocke mit geschliffenem Rand, Inhalt 2 L., gestellt. Die Glocke enthielt ein kleines Gefäss mit Chloroform, in welches einige Stückchen Löschpapier gelegt wurden, damit die grössere Oberfläche eine schnellere Verdunstung gestattete. Nach einer Stunde war der Raum gesättigt, die Quantität Chloroform im Gefäss blieb praktisch unverändert, nl. wenn die Temperatur die nämliche blieb.

Die Objekte brachte ich durch eine kleine Öffnung von oben ab in die Glocke, sodass der schwere Chloroformdampf fast gar nicht entwich.

Zum Vergleich wurde die Wirkung von mit Chloroform gesättigtem Wasser [1]) herangezogen und es zeigte sich, dass bei Zimmertemperatur diese Wirkung fast dieselben letalen Effekte hatte wie aus unterstehenden Versuchen hervorgehen wird.

1) Das Wasser wurde mit genügendem Chloroform beschickt, 2 × 24 Stunden ins Dunkel gestellt und wiederholt geschüttelt.

Nur bei den Teilen mit dicker Cuticula und mit Stomata sowie die Blätter von *Prunus laurocerasus* L. und *Aucuba japonica* Thb. wird der Dampf schneller eindringen können und grösseren Effekt haben. Wenn z.B. von einem Blatte von *Prunus laurocerasus* die eine Hälfte in Chloroformdampf, die andere in Chloroformwasser gestellt wurde, so war die erste nach 8, die andere nach 17 Minuten braungefärbt, bei *Aucuba japonica* waren diese Zahlen 15 und 30 Minuten.

Czapek l. c. S. 36 hat aus seinen Versuchen über die Einwirkung von mit Chloroform gesättigtem Wasser auf Echeveriazellen geschlossen, dass Chloroform ein Narkotikum ist, das schon in einer Konzentration mit einer von Wasser kaum abweichenden Oberflächenspannungswert Exosmose verursacht. Die Einwirkung des Chloroforms ist also von dem des Äthers und Alkohols, die bei der kritischen Oberflächenspannung von 0,685 wirken, völlig verschieden.

Sowie oben schon gesagt wurde, war es nicht meine Absicht die Reizwirkung des Chloroformdampfes und seinen Einfluss auf die Lebensprozesse zu beobachten, sowie neulich von A. A. Irving[1]) getan worden ist; vielmehr wollte ich die letalen Effekte beurteilen und eben darum war es vorteilhaft, die schnelle Einwirkung des

---

1) A. A. Irving. Annals of Botany XXV 1911. The effect of Chloroform upon Respiration and Assimilation.

Als ein Fehler dieser Arbeit muss m. E. betrachtet werden, dass die Reiz- und letale Wirkung des Chloroformdampfes nicht mit genügender Schärfe auseinander gehalten worden sind, die beobachtete CO_2-Bildung also zum Teil ein postmortaler Prozess ist. Bei der Vergleichung mit unterstehenden Versuchen ergibt sich, dass oft letale Prozesse beobachtet wurden, sowie auch aus der HCN-Bildung und Braunfärbung bei *Prunus*, sowie aus dem schlaff werden der Keimlinge hervorgeht.

gesättigten Dampfes zu benutzen. Besonders beachtete ich die Kennzeichen des Zellentodes und prüfte ob die Folgen gesteigerter oder abnormaler Enzymwirkung vor, gleichzeitig mit, oder nach dem Tode hervortraten. In Übereinstimmung mit Obenstehendem wurden bei den verschiedenen Objekten verschiedene Kriteria des Zellentodes benutzt und die Objekte so lange beobachtet, bis es unzweideutig hervortrat, dass entweder der Tod eingetreten war, oder die Objekte sich von der Chloroformeinwirkung erholt hatten.

So war das Exosmieren des Anthocyans stets ein Zeichen der völligen Permeierbarkeit des Protoplasmas, die nicht mehr rückgängig gemacht werden konnte, ebenfalls das schlaff werden der Teile mit dem Hervortreten von Flüssigkeitströpfchen, wonach niemals Deplasmolyse mehr möglich war.

Das an und für sich unschädliche Säureviolett (Vergl. die obengenannte Arbeit von Stracke), das in die lebenden Zellen nicht eindringt, war ebenso in einigen Fällen ein vorzügliches Mittel zur Konstatierung des Todes.

Alle Versuchen wurden bei einer selben Temperatur von 11—12° C. angestellt, eine notwendige Bedingung, sowie sich unten ergeben wird. [1]) Später werde ich dann einige andre Beobachtungen mitteilen über die Resultate bei verschiedener Temperatur.

Natürlich ist es bei mehrzelligen Organismen nicht zu vermeiden, dass der einmal in die Teile diffundierte Chloroform mit seiner Einwirkung fortfährt, wenn die Objekte aus der Glocke herausgenommen sind, jedenfalls wurden

1) v. Rysselberghe (Bull. de la Cl des Sc. Ac. royale Belgique 1901) zeigte, dass die Permeabilität des lebenden Plasmas für Wasser und unschädliche Salzlösungen bei Temperatursteigerung zunimmt.

jedoch die dafür geeigneten Objekte, sowie Keimwurzel und Parenchymschnitte sofort nach dem Entfernen aus der Glocke mit Wasser abgewaschen.

Von den zahlreichen Beobachtungen werde ich stets für eine Zeitperiode nur eine Beobachtung mitteilen, es sei denn, dass auf der Todesgrenze die Resultate verschieden ausfallen. Stets benutzte ich, soviel wie möglich war, z. B. bei *Prunus laurocerasus* L., *Aucuba japonica* Thb. und *Magnolia* Blätter resp. Blumenblätter eines Individuums oder bei *Beta* Schnitte aus einer Wurzel um den Schwierigkeiten, welche die individuelle Variabilität bietet, tunlichst vorzubeugen.

1es Objekt. Keimpflanzen von *Triticum vulgare* Vill. Wurzeln 1—2 cm., das erste Blatt tritt noch nicht aus der Kotyledonarscheide hervor.

Einwirkung von Chloroformdampf.

Nach 5′ Austreten von viel Tröpfchen aus der Scheide, diese ist schlaff und nicht mehr zu deplasmolysieren. Die Wurzeln färben sich mit Säureviolett.

Nach 3′ Austreten von sehr wenig Tröpfchen aus der Scheide, diese ist noch nicht sofort, sondern später schlaff; die Wurzeln färben sich.

Nach 2′ Austreten der Tröpfchen nicht sofort, sondern später; die Wurzeln färben sich.

Nach 1′. Später Austritt der Tröpfchen.

Nach 30″—60″ Dito, die Wurzeln sind wenigstens in den oberen Zellschichten bleibend geschädigt und erholen sich ebensowenig wie die Scheide, die später schlaff wird. Längeres Auswaschen in Wasser hat kein Resultat. Zuerst färben sich die Wurzeln hart hinter der Calyptra [1].

Nach 15″. Meistens nicht bleibend geschädigt, zuweilen sehr schwache Färbung der Wurzeln.

---

1) Vergl. dazu die Arbeit von Rufz de Lavison. Rev. générale de Botanique 1911.

Letale Einwirkungszeit für die Wurzeln 15′—30′, für die Scheide 30′—60′.

Für lufttrockne ungekeimte Samen ist die letale Einwirkungszeit mehr als 240 Stunden. Die Samen welche so lange in der Glocke verweilt haben, keimen ganz gut; für wasserreiche, gequollene Samen ist die letale Einwirkungszeit 30—60 Minuten [1].

2es Objekt. *Pisum sativum* L. Keimwurzel 1 à 2 cm., gekeimt zwischen Löschpapier.

a. Einwirkung von Chloroformdampf.

Nach 4′. Wurzel schlaff, Deplasmolyse unmöglich, färbbar mit Säureviolett.
„ 3′. „ „ „ „ „ „ „
„ 2′. „ „ „ „ „ „ „
„ 1′. nicht schlaff schwach färbbar (8 Individ)
„ 1′. „ „ nicht färbbar (2 „)
„ 30′-60′ „ „ nicht sofort färbbar, jedoch zum Teil bleibend geschädigt, denn nach dem Auswaschen während einer Stunde in Wasser, war die Wurzel hinter der Calyptra in Rinde und Zentralcylinder färbbar.
„ 15′ nicht bleibend geschädigt.

Letale Einwirkungszeit für die Wurzel ± 30′.

b. Einwirkung von mit Chloroformdampf gesättigtem Wasser 12° C.

Nach 4′. Wurzel schlaff, Deplasmolyse unmöglich, färbbar mit Säureviolett.
„ 3′. nicht sofort schlaff, nur nach einigen Minuten, „ „ „
„ 2′. nicht schlaff, „ „ „
„ 1′. „ „ meistens „ „ „
„ 30′. „ „ fast nicht „ „ „

Letale Einwirkungszeit 30′—60′.

Für lufttrockne, ungekeimte Samen ist die letale Einwirkungszeit mehr als 240 Stunden, für gequollene Samen 30—60 Minuten.

1) Als Grenze betrachte ich die längste Einwirkungszeit, bei welcher der Keimprozent nicht merklich abnimmt.

3es Objekt. *Beta vulgaris* L. Nicht zu dünne Schnitte aus dem roten Parenchymgewebe der Wurzel werden zuvor gut in Wasser von 12° C. abgewaschen, sodass kein Anthocyan mehr austritt. Dann werden sie mit einer Nadel in die Glocke gebracht und auf einen Kork gesteckt, sodass der Chloroformdampf gut einwirken kann. Nach der Einwirkung werden sie wiederum abgewaschen und auf Objektgläser gelegt, um zu sehen ob das Anthocyan aus den Zellen exosmiert.

Einwirkung von Chloroformdampf. (Versuche in Februar).
Nach 5′ sofort Austritt des Anthocyans.
„ 2′ „ „ „ „
„ 1′ „ „ „ „ (4 Versuche).
„ 1′ nicht sofort Austritt sondern nach 2 Minuten (2 Versuche).
„ 1′ kein Austritt (9 Versuche).
„ 30″ kein Austritt.
Letale Einwirkungszeit ± 60″.

Chloroformwasser hat bei 12° C. eine fast eben so lange letale Einwirkungszeit, die Grenze ist weniger scharf. Bei höherer Temperatur ± 22° C. ist die Einwirkung des gesättigten Dampfes viel schneller als die einer gesättigten wässerigen Lösung.

Je älter die Wurzeln sind, je kürzer die letale Einwirkungszeit wird, in März fand ich bei einigen Versuchen stets ± 40″, in April 10″—20″.

4es Objekt. *Beta vulgaris* (Viehrübe). Die Wurzeln haben ein farbloses Parenchym im Zentralcylinder, mit einer Schicht anthocyanhaltiger Zellen in der Rinde. Werden die nicht zu dünnen Schnitte sofort nach dem Schneiden gut abgewaschen, so fängt an der Luft die Schwarzfärbung nach ± 3 Stunden an.

Einwirkung von Chloroformdampf. Behandlung wie oben.

Nach 3′ sofort Exosmose des Anthocyans, ± 3 Minuten nach dem zweiten Abwaschen wird die Schwarzfärbung sichtbar.

Nach 1′ fast sofort Exosmose des Anthocyans. Die Schwarzfärbung wird 5—10 Minuten nach dem Abwaschen sichtbar.

Nach 30″. Keine Exosmose des Anthocyans. Schwarzfärbung nach einigen Stunden.

Letale Einwirkungszeit 30″—60″.

Stets erfolgt die Schwarzfärbung, welche das erste sichtbare Resultat einer Oxydase-einwirkung ist, einige Minuten nach dem Anfang der Anthocyanexosmose, nachdem also wenigstens in der Rinde die relative Impermeabilität aufgehoben ist.

5es Objekt. *Solanum tuberosum* L. Weisse, etiolierte Schösslinge. Länge 1—4 cm.

Nach der Chloroformeinwirkung stellte ich die Schösslinge bei 12° C. in eine wasserreiche Atmosfär um zu sehen ob der Tod bald erfolgen würde. Nicht zuvor durch Chloroform getötete Schösslinge blieben in dieser Umgebung mehr als 24 Stunden unverändert.

Einwirkung von Chloroformdampf.

Nach	5′	Braunfärbung	Austritt von Flüssigkeitströpfchen.
„	4′	„	„ „ „
„	3′	nicht sofort Braunfärbung	„ „ „
„	2′	„ „ „	sondern nach 30′, zuvor Austritt von Tröpfchen.
„	1′	„ „ „	„ „ 30′, kein „ „ „
„	30″	„ „ „	„ „ 120′, „ „ „ „
„	30″	kein „	

Letale Einwirkungszeit ± 30″.

Die Braunfärbung wird z. B. bei 2—3 Minuten Chloroformeinwirkung mehrere Minuten nach dem Austritt der Tröpfchen, also nach dem Verlust der relativen Impermeabilität sichtbar.

6[es] Objekt. *Salix purpurea* L. Etiolierte Schösslinge. Länge 1—2 cm.

Einwirkung von Chloroformdampf. Nach der Einwirkung liess ich die Schösslinge an der Luft bei 12° C. liegen um den Anfang der eventuellen Schwarzfärbung zu beobachten.

Nach	5′	Austritt von Flüssigkeitströpfchen,	sofort Anfang der Schwarzfärbung.
„	3′	„ „ „	Schwarzfärbung nach ± 2′.
„	2′	„ „ „	„ „ ± 6′.
„	1′	„ „ „	„ „ ± 8′.
„	30″	kein Austritt von „	sofort, sondern nach 1′. Schwarzfärbung nach ± 12′.
„	30″	„ „ „ „	keine Schwarzfärbung nach 3 Stunden.

Letale Einwirkungszeit 15″—30″.

Die Schwarzfärbung, welche die Folge einer Catecholzerlegung durch die Catecholase [1]) ist, wird stets mehrere Minuten nach dem Schwinden der relativen Impermeabilität sichtbar.

7[es] Objekt. *Isatis tinctoria* L. Etiolierte Keimpflanzen. Länge 1—2 cm.

Nach der Einwirkung liess ich die Keimpflanzen an der Luft liegen um den Anfang der eventuellen Verfärbung zu beobachten. Die Keimpflanzen sind nl. gelb gefärbt und durch die Bildung des blauen Indigofarbstoffes färbt sich am ersten der gekrümmte Teil des Hypocotyls schön grün. Weiter wie oben. Nach 1′—2′ Einwirkung erfolgt der Austritt von Flüssigkeitströpfchen innerhalb einer Minute, die Grünfärbung fängt 5′—15′ später an.

Letale Einwirkungszeit ± 60″, wenigstens in wasserreicher Atmosfär.

Die Verfärbung, welche die Folge der Spaltung des Isatans durch Isatase und der Oxydation des dabei gebil-

1) Weevers Th. Recueil des trav. bot. Néerl. 1910.

deten Indoxyls zu Indigo ist, wird also stets mehrere Minuten nach dem Schwinden der relativen Impermeabilität sichtbar.

8es Objekt. *Lonicera Periclymenum* L. Junge Knospen 0,5 bis 1 cm. gross. Einwirkung von Chloroformdampf.

Nach 4′ Austritt von Tröpfchen, später Verfärbung.
„ 3′ „ „ „ „ „
„ 2′ „ „ „ „ „
„ 1′ kein Austritt „ „ jedoch nach 10′ schlaff und verfärbt.
„ 30″ „ „ „ „ „ „ 60′ „ „ „
„ 30″ „ „ „ „ nach 12 Stunden nicht schlaff und verfärbt
„ 15″ „ „ „ „ „ 12 „ „ „ „ „

Letale Einwirkungszeit ± 30″, das Verfärben erfolgt stets später als der Austritt der Tröpfchen.

9es Objekt. *Magnolia precia* Cox. Weisse Blumenblätter. Die Blätter liess ich nach dem Herausnehmen aus der Glocke an der Luft liegen zur Beobachtung der eventuellen Braunfärbung.

Nach 2′ Braunfärbung der ganzen Blätter.
„ 1′30″ „ „ „ „
„ 1′ „ „ „ „
„ 1′ „ nicht sofort, sondern nach ± 5″.
„ 45″ „ „ „ „ „ ± 10″.
„ 30″ „ „ „ „ „ ± 15″.
„ 15″ „ „ „ „ „ ± 20″.
„ 10″ „ „ „ „ „ ± 20″.
„ 5″ „ „ „ „ „ ± 25″.

Wenn zwei Blumenblätter zugleich in die Glocke gestellt werden und das eine nach 10″ herausgenommen, das andere darin gelassen wird, so erfolgt die Braunfärbung viel schneller im herausgenommenen Blatte, tritt jedoch nur in der Epidermis auf, während das andere zwar später

jedoch völlig braun wird. Das herausgenommene Blatt sieht dann gerade so aus wie die Blumenblätter, die der Frost gebräunt hat. Bei der Nekrobiose, die sowohl Frost, wie Chloroformdampf hervorrufen, ist eine Oxydasewirkung die Ursache der Bildung eines braunen, in Wasser fast unlöslichen Produktes (s. unten).

Letale Einwirkungszeit für die Epidermiszellen $< 5'$.

10es Objekt. Blätter von *Aucuba japonica* Thb. (erwachsen). Die Schwarzfärbung, die bei Nekrobiose auftritt, ist nach Bourquelot und Herissey[1]) die Folge der Bildung des Aucubigenins, des Spaltungsproduktes des Aucubins. Austritt von Flüssigkeitströpfchen war bei den erwachsenen Blättern nicht zu beobachten. (Versuche im Winter).

Einwirkung von Chloroformdampf.

Nach 15′ Anfang der Braunfärbung.
„ 12′ „ „ „
„ 4′ normal, 9′ nach dem Herausnehmen fängt die Färbung an.
„ 2′ „ 14′ „ „ „ „ „ „ „
„ 1′30″ „ einige Stunden „ „ „ „ „ „ „
„ 1′ Nach 24 Stunden noch normal, kein Nekrobiose.

Letale Einwirkungszeit $\pm$ 1′30″.

Für junge Blätter (Grösse 1—2 cm.) ist die letale Einwirkungszeit $\pm$ 15″. Hier tritt die Braunfärbung stets 1—2 Minuten nach dem Austritt von Flüssigkeitströpfchen hervor.

11es Objekt. Schön grüne Blätter von *Prunus laurocerasus* L. (Versuche im Winter).

Nach 30′. Anfang der Färbung des Guignardschen Löschpapiers. Blätter schon lange braun, deutlicher HCN-geruch.
„ 25′. Dito.

1) Bourquelot und Herissey. Ann. Chim. Phys. 8me ser. t. IV.

Nach 20′. Löschpapier unverändert, deutlicher HCN-geruch. Braunfärbung.
„ 15′. „ „ „ „ „
„ 12′. Anfang der Braunfärbung, noch kein HCN-geruch.
„ 8′. „ „ „ „ „ „ .
„ 5′. Keine Färbung, diese fängt 3′ nach dem Herausnehmen an, einige Minuten später HCN-geruch.
„ 4′. „ „ diese fängt ± 4′ nach dem Herausnehmen an.
„ 2′. „ „ „ „ ± 5′ „ „ „ „ später HCN-geruch.
„ 1′30″. „ „ „ „ ± 6′ „ „ Herausnehmen an.
„ 1′. „ „ „ „ 5 Stunden „ „ „
„ 1′. „ „

Letale Einwirkungszeit ± 1′—1′30″.

Für junge Blätter und Schösslinge (Grösse 1—2 cm.) ist die letale Einwirkungszeit < 15″. Die Zeit ist sehr abhängig vom Wasserreichtum der Gewebe. Je wasserärmer die erwachsenen Blätter sind, je länger die letale Einwirkungszeit ist: z. B. bei lufttrocknen Blättern, die ± 90 % ihres Wassers verloren haben ist die Zeit, welche zur Braunfärbung erforderlich ist 8—12 Stunden [1]). Lufttrockne Blätter, welche über $CaCl_2$ getrocknet sind, bleiben bei der Chloroformdampfeinwirkung in einer mit $CaCl_2$ beschickten Glocke tagelang schön grün.

Für dieses Objekt kann ich die Empfindlichkeit des Guignardschen Reagens nicht so besonders gross nennen, der Geruchssinn verrät die Blausäureanwesenheit stets einige Minuten früher. Meistenfalls ist es zu beobachten, dass der Anfang der Braunfärbung eher auftritt, als der HCN-geruch, weil dieser HCN ja erst aus dem Blatte heraus diffundieren muss.

Wenn wir die Resultate dieser Versuche überblicken, so sehen wir zunächst, dass die letale Einwirkungszeit

1) Vergl. obengenannte Arbeit von A. A. Irving.

des gesättigten Chloroformdampfes bei ± 12° C., für die empfindlichen, wasserreichen Objekte im Allgemeinen 15—60 Sekunden [1]), sogar für die Epidermis der Magnoliablumenblätter weniger als 5 Sekunden ist. Bei ziemlich resistenten Objekten, wie erwachsenen, frischen Blättern von *Aucuba japonica* Thb. und *Prunus laurocerasus* L. beläuft sie sich nur auf 1—2 Minuten [2]). Die Zeit ist sehr vom Wasserreichtum der Gewebe abhängig; je wasserärmer die erwachsenen *Prunus laurocerasus* Blätter sind, je länger ist die zur Braunfärbung erforderliche Zeit und lufttrockne Samen von *Pisum sativum* und *Triticum vulgare* können mehr als 240 Stunden in gesättigtem Choroformdampf verweilen und dennoch ganz gut keimen, während wasserreiche nach 30—60 Minuten ihre Keimkraft eingebüsst haben.

Es kann deshalb nicht wundern, dass Mirande bei empfindlichen Objekten wie *Photenia serrulata* und *Thalictrum aquilegifolium* nach einigen Minuten HCN bildung beobachtete.

Mir gelang es bei *Prunus laurocerasus* jedoch niemals die Blätter lebendig zu erhalten nachdem Blausäurebildung nachweisbar war, stets trat zuvor Braunfärbung der Blätter zu Tage und starben diese ab. Brachte ich die Blätter zugleich mit dem Chloroform in die Glocke, fand deshalb eine langsamere Einwirkung des noch nicht gesättigten Dampfes statt, so dauerte das Absterben länger, das

---

1) Nach den Angaben von Boeseken und Waterman (Versl. kon. Akad. v. Wet. A'dam Jan. 1912) gilt dies für *Penicillium glaucum* nicht und kann dieser Pilz sich in mit Chloroform gesättigtem Wasser entwickeln. Bei meiner Versuchsanstellung konnte ich dieses Resultat jedoch nicht erhalten, sogar in einer guten Nährlösung (1 % Glukose mit den erforderlichen Salzen) entwickelten sich die geimpften Sporen nicht, wenn die Nährlösung in einem mit Chloroformdampf gesättigten Raume gestellt war. Blieb das sporentragende Mycelium ± eine Woche in einem mit Chloroformdampf gesättigten Raume, so hatten die Sporen ihre Keimkraft eingebüsst.

2) Vergl. dazu das oben zu der Arbeit Irvings Gesagte.

Resultat blieb jedoch unverändert. Die Angaben von Mirande kann ich in dieser Hinsicht also nicht bestätigen. [1])

Liefern meine Ergebnisse nun eine Stütze für die Annahme von H. E. und E. F. Armstrong, dass die Einwirkung von Chloroform eine spezielle Stimulierung der Enzymtätigkeit zu Stande bringt? Durchaus nicht, und es kommt mir' vor dass die Vergleichung des Chloroforms mit den Hormonen Starlings, weder eine fruchtbare noch eine zutreffende zu nennen ist. Die Chloroformeinwirkung, ich meine die letale und nicht die Reizwirkung offenbart sich zuerst durch ein Schwinden der relativen Impermeabilität, das Todeskriterium, wie ich oben gezeigt habe und bei mehreren Objekten, wie *Beta vulgaris* (Viehrübe), Schösslingen von *Solanum tuberosum* L. und *Salix purpurea* L., Keimpflanzen von *Isatis tinctoria* L. sind die ersten Beweise einer gesteigerten oder besser abnormalen Enzymwirkung einige Zeit später, wenn die Glykoside nach dem Permeieren durch die Enzyme gespaltet werden zu beobachten. Die untersuchten Glykoside permeieren also bei der Chloroformeinwirkung nur nach, nicht vor dem Tode und dieser Vorgang lässt sich durchaus nicht mit dem oben erwähnten Permeieren der Kohlehydrate bei Einwirkung bestimmter, äusserer Einflüsse vergleichen.

Die von Beyerinck gestellte Grenze zwischen Nekrobiose und Leben ist bis jetzt also nicht verwischt [2]).

---

1) In einer späteren Arbeit (C. R. 1910), die mir zur Einsicht kam, als ich meine Untersuchungen schon abgeschlossen hatte, widerruft Mirande zwar nicht seine frühere Ergebnisse, sagt jedoch in Uebereinstimmung mit meiner Folgerung: „ces phénomènes sont dus à la diffusion après la mort du protoplasme.

2) Waller, A. D. (Proc. royal. soc. 1910), der ein bestimmtes Reagieren auf einen Induktionsschlag als ein charakteristisches Lebenszeichen betrachtet, konstatierte bei *Prunus laurocerasus* nach einer Minute Chloroformeinwirkung das Fehlen der elektrischen Reizbarkeit und weil erst einige Minuten später die HCN Bildung zu beobachten war, nennt auch er die Blausäurebildung ein postmortales Phänomen.

Obenstehende Folgerungen über die Chloroformeinwirkung lassen sich auch mit den Betrachtungen Lepeschkins [1]) über die Einwirkung von anästhesierenden Stoffen auf die osmotischen Eigenschaften der Plasmamembran ganz gut vereinbaren. Lepeschkin hat wahrscheinlich gemacht, dass derartige Körper im Dispersionsmittel der Plasmamembran gespeichert werden, sodass bei einer bestimmten Konzentration des Chloroforms in der wässerigen Aussenlösung, sein Gehalt in der Plasmamembran so gross wird, dass die hervorgerufene Änderung der Dielektrizitätskonstante des Dispersionsmittels zur Koagulation der Eiweisskörper führt, welche Koagulation wiederum den Verlust der relativen Impermeabilität der Plasmamembran zur Folge hat. Diese Betrachtung gibt meines Erachtens eine mehr annehmliche Erklärung der Tatsachen als diejenige Armstrongs. Die Annahme von Hormonen ist für die letale Wirkung völlig überflüssig; wie die Reizwirkung der Anästhetica aufzufassen ist, liegt ausser dem Rahmen dieser Arbeit.

Bei mehreren Versuchen konstatierte ich einen Austritt von Flüssigkeitströpfchen; das versteht sich ja, denn beim Verlust der relativen Impermeabilität wird in den vorher vom Turgor gespannten Zellen, die Elastizität der Zellmembranen eine Kontrahierung bedingen, die einen Austritt von Wasser mit gelösten Stoffen zur Folge haben muss. Bei erwachsenen Teilen mit grossen Interzellularen

1) Lepeschkin W. W. Ber. d. d. bot. Ges. 1911. In dieser Arbeit unterscheidet L. ebenso wie ich oben tat die gelinde Einwirkung der Anästhetica, die die osmotischen Eigenschaften der Membran derart ändert, dass alle Stoffe, die sich im Narkotikum schlecht, im Wasser gut lösen, während der Narkose langsamer permeieren, von der letalen Einwirkung (s. oben).

Vergl. dazu auch das oben über die Endospermentleerung unterm Einfluss des Chloroformierens Gesagte.

tritt das Wasser nur in diese Räume und kommt an der Oberfläche nicht zum Vorschein, dieser Vorgang macht dann die Teile mehr oder weniger transparent. Liess ich junge Wedel einer *Asplenium* spec., die sonst den Wasseraustritt ganz gut zeigen so lange an der Luft welken, dass sie ganz schlaff und also die Zellmembranen fast völlig entspannt sind [1]), so gaben diese Wedel in der Chloroformatmosfär keinen Austritt von Flüssigkeitströpfchen. Dasselbe beobachtete ich bei jungen Schösslingen von *Aucuba japonica* Thb. und Blattstielen von *Tropaeolum majus* L.

Damit ist die Beobachtung Guignards [2]), dass der Protoplast sich bei der intensiven Chloroformeinwirkung von der Zellwand löst, nicht in Widerspruch, denn nach dem Verlust der selektiven Permeabilität kann durch die bei der Plasmakoagulation stattfindende Entwässerung der Plasmastoffe Wasser austreten, und schrumpft der tote Protoplast.

Im Verlust der relativen Impermeabilität müssen wir jedoch den Hauptmoment suchen, nicht in einer besondern Wasserabgabe verursachenden Affinität des Protoplasmas für Chloroformdampf, wie R. Dubois [3]) behauptet, ebensowenig in einer Änderung der Obenflächenspannung wie Giglioli [4]) tut. Diese Änderung der Obenflächenspannung unterm Einfluss der Anästhetica will ich durchaus nicht verneinen, allein sie ist hier nur Nebensache und wer den Verlust der relativen Impermeabilität nicht in seiner Bedeutung würdigt, dem fehlt die richtige Einsicht in die

1) Die Wedel waren noch gut lebendig, denn Kontrollehälften in Wasser gelegt wurden wieder völlig turgeszent.

2) Guignard L. C. R. 1909.

3) Dubois R. C. R. 1886.

4) Giglioli I. Rendic. d. R. Accad. d. Lincei 1911.

Phänomene. Wiewohl R. Dubois also schon im Jahre 1886 den Austritt von Wasser bei Chloroformeinwirkung beobachte, ist, beim Fehlen einer guten Deutung der Tatsache, der Wert seiner Arbeit nicht so hoch anzuschlagen wie Giglioli tut.

Zum Schluss noch einige Worte über die letale Wirkung einiger andern Anästhetica in Dampfzustand. Dazu kann man in unserm Fall auch die ätherischen Öle rechnen, die bei letaler Einwirkung dieselbe Erscheinungen, die ich oben beschrieben, zu Stande bringen. Ihre Wirkung ist jedoch viel weniger intensiv wie schon Heller [1]) gezeigt hat.

Ich prüfte z. B. von den ätherischen Ölen [2]) *Oleum Rosmarini* und *Ol. Lavandulae* und benutzte als Objekt Schnitte von *Beta vulgaris* und Blätter von *Prunus laurocerasus.*

Für ersteren Objekt waren die letalen Einwirkungszeiten (Versuche in März) resp. 30'—40' und 35'—50' also mehr als 40 Mal so lange als beim Chloroformdampf.

Für letztern Objekt dauerte es bei Rosmarin- und Lavandelöl resp. 2—3 und 5—7 Stunden ehe die Braunfärbung der Blätter und später HCN Bildung auftrat. Also ± 20 und 45 Mal so lange als beim Chloroformdampf und gerade Lavandelöl nennt Giglioli als einen Stoff, der von den ätherischen Ölen am intensivsten wirkt.

Von andern flüchtigen Stoffen untersuchte ich die Folgenden: Die letalen Einwirkungszeiten stehen in Klammern; das Objekt war *Beta vulgaris,* die Grenze der Exosmose des Anthocyans war oft nicht scharf zu beobachten. Stets war die Glocke mit dem Dampfe gesättigt, als die Versuche anfingen.

Äther (3'—5'), norm. Amylalcohol (3'—5'), Tetrachlor-

1) Heller A. Flora 1904.

2) Die Glocke war dann von der mit ätherischem Öle gesättigten Luft gefüllt. Vergl. dazu die Arbeit Hellers.

kohlenstoff (4′—6′). Benzol, Äthylalkohol, Toluol und Metakresol mehr als 4 Minuten. In einer Atmosfär von Leuchtgas und von Acetylen waren die Zeiten mehr als 5 Minuten. Wenn wir bedenken, dass für Chloroform die Zeit ± 40″ ist, so wird es deutlich wie sehr letzterer Stoff die andern in Giftigkeit übertrifft.

Bekanntlich dringt der Ammoniadampf sehr schnell in die Zellen ein [1]), bei gesättigtem Dampfe war nach 5″ eine deutliche Verfärbung, die beim Auswaschen in viel Wasser schwand, zu beobachten. Nach Einwirkung während 60″ blieben die Schnitte nach dem Abwaschen bräunlich, Exosmose trat jedoch viel später, obschon früher als in den nicht behandelten Schnitten auf.

Bei *Prunus laurocerasus* beobachtete ich die Einwirkung von normalem Amylalkohol (Braunfärbung nach 1½—2 Stunden) und von Ammoniadampf (Braunfärbung nach 5—6 Minuten, letztere also schneller als von Chloroformdampf).

Bei der Einwirkung von Dämpfen von Catechol und Saligenin, Stoffen, die nur sehr wenig flüchtig sind, bleiben die Blätter von *Prunus laurocerasus* tagelang lebendig und unverändert. Dies stimmt nicht völlig mit den Ergebnissen Mirandes [2]); ebensowenig dass ich bei der Einwirkung des Metakresoldampfes die Blausäurebildung, obschon nach längerer Zeit beobachten konnte.

Obenstehende Betrachtungen über die letale Wirkung haben in allen diesen Fällen ebenso gut ihre Gültigkeit und den einigermassen phantastischen Betrachtungen Gigliolis l. c. über die Wasserbewegung in den Pflanzen kann ich keinen Wert beimessen.

1) Pfeffer W. Osmotische Untersuchungen 1877.
Ruhland. Jahrb. f. Wiss. Botanik 1908.

2) Mirande M. (C. R. 1910).

§ 3. Die letale Einwirkung von Chloroformdampf bei variabler Temperatur und Tension.

Es lag auf der Hand ebenfalls Beobachtungen über die letale Einwirkung von Chloroformdampf anzustellen, wenn entweder Temperatur, oder Tension oder beide verschieden sind. Ich wählte *Prunus laurocerasus* L., *Aucuba japonica* Thb. und *Beta vulgaris* L., zur Konstatierung der letalen Einwirkungszeit und prüfte bei den drei ersteren Objekten und ebenfalls bei den Blumenblättern von *Magnolia* und den Schösslingen von *Salix purpurea* L. die Zeit der permanenten Chloroformdampfeinwirkung, die zur Erreichung der ersten sichtbaren Braun- oder Schwarzfärbung (Färbungszeit) erforderlich war.

Zuerst untersuchte ich die Einwirkung von gesättigtem Dampfe bei verschiedener Temperatur und wählte im Anschluss an die übrigen Arbeiten auf diesem Gebiete und mit Rücksicht der bekannten Regel von van 't Hoff Intervalle von 10° C., beobachtete bei 0—1° C., 10—11° C., 20—21° C., 30—31° C. Natürlich war es nötig die Teile zuvor auf die bezügliche Temperatur zu bringen; dies geschah bei *Beta vulgaris* Schnitten in Wasser, bei den andern Objekten in feuchter Luft.

Wir können sagen, dass die letale Einwirkungszeit der Schnelligkeit der Prozesse, die den Tod hervorrufen umgekehrt proportional ist und ebenfalls, dass je schneller die Farbstoffbildung erfolgt in umso kurzer Zeit die Farbe eine derartige Intensität erreicht hat, dass sie eben wahrnehmbar wird. In der Art können wir hier von Prozessen reden, deren Schnelligkeitssteigerung bei Temperaturintervallen von 10° C. wir beobachten und durch Temperaturkoeffizienten ausdrücken. Der Quotiënt der Einwirkungszeiten, bei n° C. und n + 10° C. gibt also die Temperaturkoeffizienten, die zwischen Klammern hinzugefügt sind.

Prunus laurocerasus.

Temperatur.	Let. Einwirkungszeit.			Färbungszeit.		
1— 2° C.	4'—5',	± 4'30"	[3,6]	21'—26',	± 23½'	[2,6]
11—12° C.	1'—1'30",	± 1'15"	[1,8]	8'—10',	± 9'	[2,4]
21—22° C.	40"—45",	± 42,5"	[1,9]	3'30"—4',	± 3'45"	[2,1]
31—32° C.	20"—25",	± 22,5"		1'30"—2',	± 1'45"	

Aucuba japonica.

Temperatur.	Letale Einwirkungszeit.			Färbungszeit.		
1— 2° C.	4'30"—5'30",	± 5'	[2,7]	40'—45',	± 42½'	[3,1]
11—12° C.	1'30"—2'10",	± 1'50"	[1,8]	12'—15',	± 13½'	[3]
21—22° C.	50"—70",	± 60"	[2,2]	4'— 5',	± 4½'	[1,8]
31—32° C.	25"—30",	± 27½"		2'— 3',	± 2½'	

Salix purpurea.

Temperatur.	Zum Wasseraustritt erforderliche Zeit. [1]			Färbungszeit.		
1— 2° C.	1'40"— 2',	± 110"	[2,8]	13½'—14½',	± 14'	[2,8]
11—12° C.	30"—50",	± 40"	[2,3]	4½'— 5½',	± 5'	[2,2]
21—22° C.	15"—20",	± 17½"	[2,5]	2'— 2½',	± 2'15"	[2,0]
31—32° C.	5"—10",	± 7½"		1'— 1¼',	± 1'07"	

Mittelwert 2,32.

Beta vulgaris (Schnitte). [2]

Temperatur.	Let. Zeit 1es Objekt (Februar).			Let. Z. 2es Objekt (März).		
1— 2° C.	115"—135",	± 125"	[2,1]	115"—120",	± 117½"	[2,5]
11—12° C.	55"— 65",	± 60"	[2,2]	45"— 50",	± 47½"	[2,4]
21—22° C.	25"— 30",	± 27½"	[2,2]	17"— 22",	± 19½"	[2,2]
31—32° C.	10"— 15",	± 12½"		7"— 11",	± 9"	

1) Das Hervortreten der Flüssigkeitströpfchen ist stets nur einige Sekunden nach dem Verlust der relativen Impermeabilität zu beobachten, diese Zeiten sind deshalb etwas länger als die letale Einwirkungszeiten.

2) Bei diesen Versuchen benutzte ich als Kriterium die eben anfängende Exosmose des Anthocyans, die scharf beobachtet werden kann.

3es Objekt (Versuch in April).

Temperatur.	Letale Zeit.			
1— 2° C.	60″—65″,	± 62½″	[3,1]	Mittelwert zwischen 1½° und 21½° C. = 2,63.
6— 7° C.	35″—40″,	± 37½″		
11—12° C.	18″—22″,	± 20″	[2,5]	
16—17° C.	13″—17″,	± 15″	[2,2]	
21—22° C.	7″—11″,	± 9″		

Magnolia (Blumenblätter).

Temperatur.	Färbungszeit.			
1— 2° C.	3′30″— 4′,	± 225″	[3,2]	Mittelwert zwischen 1° und 31° C. = 2,62.
11—12° C.	60″—80″,	± 70″	[3,1]	
21—22° C.	20″—25″,	± 22½″	[1,8]	
31—32° C.	10″—15″,	± 12½″		

Die Temperaturkoeffizienten liegen also dem Anschein nach im Allgemeinen zwischen 1,8 und 3,2 und nehmen bei steigender Temperatur ab.[1]) Dieses Resultat könnte uns zur Meinung, dass sowie bei anderen physiologischen Prozessen der van 't Hoffsche Regel hier Gültigkeit hätte, Veranlassung geben und dennoch ist dies *unrichtig*.

Wir müssen nicht vergessen, dass die Tension eines gesättigten Dampfes sich mit der Temperatur weitgehend ändert, im Allgemeinen rechnet man für eine Temperaturerniedrigung von 10° C. eine Abnahme der Tension im Verhältniss von 1,5 : 1. Rex[2]) hat die Dampftension des

1) Im Allgemeinen nehmen die Koeffizienten mit steigender Temperatur ab, so wie schon van 't Hoff (Vorlesungen 1898) erwähnt und später von Trautz und Volkmann (Zeitschr. f. phys. Chem. 1908) nachdrücklich hervorgehoben wurde. In der Nähe, wahrscheinlich unterhalb 20° C fanden letztere Autoren für die Esterverseifung mittelst Barytwassers ein Maximum, welche Tatsache sie der inneren Reibung des Mediums zuschreiben.

2) Rex. Zeitschr. f. phys. Chemie 1906.

Chloroforms für 0° C., 10° C., 20° C. und 30° C. bestimmt; ich konnte also die Formel für Dampftensionen bei verschiedener Temperatur $\log p = k - m \log T - \frac{n}{T}$, die Dupre-Herz [1]) gegeben haben, prüfen und sie stimmte ganz gut mit den von Rex gemessenen Werten. Es war mir deshalb möglich die Dampftensionen bei 1½, 11½, 21½, 31½° C. zu berechnen und es ergab sich, dass bei diesen Temperaturintervallen von 10° C. die Tension zunimmt im Verhältniss von 1 bis 1,50—1,60.

Für weitere Schlussfolgerungen war es also unbedingt notwendig zu untersuchen, ob eine ohne Temperaturwechsel stattfindende Änderung der Dampftension auf die letale Einwirkungszeit Einfluss ausübte.

Die Objekte, welche ich dazu benutzte, waren: Schnitte aus dem roten Parenchym von *Beta vulgaris* und etiolierte Schösslinge von *Salix purpurea.* Die Versuche fanden bei einer Temperatur von 20° C. statt und die benutzten Tensionen waren: gesättigt = 160 mm., 106½ mm. (⅔ gesättigt), 80 mm. (½ ges.), 53 mm. (⅓ ges.), 40 mm. (¼ ges.), 32 mm. (⅕ ges.). Bei den Versuchen mit ungesättigtem Dampfe war das Verfahren folgendes. In die Glocke (Inhalt 2 L.) brachte ich, nachdem die Temperatur konstant war, eine abgewogene Quantität Chloroform, die eben zur Erreichung der gewünschten Tension genügte und liess diese völlig verdampfen. Die Totaltension wurde dabei natürlich grösser als 760 mm., und weil das in die Glocke bringen der Objekte nur bei Atmosfärendruck stattfand, musste ein Teil des Dampfgemisches entweichen. Dies geschah durch eine oben angesetzte zweimal U-förmig

1) **Dupre—Herz. Wiedem. Ann. 1882; für Chloroform sind die Werte der Konstanten $k = 19{,}2979$, $m = 3{,}9158$, $n = 2179{,}1$, p ist die Tension in mm., T. die absol. Temperatur.**

gebogene Röhre und bei Vorversuchen bestimmte ich die Quantität $CHCl_3$, welche durch die, alkoholische Kalilauge enthaltende, Röhre entwich. Die Bestimmung geschah durch Verseifung des $CHCl_3$, mittelst alkoholischer Kalilauge und massanalytische Bestimmung des gebildeten Chlorkaliums nach Volhard.

Die Quantität war jedoch durch die Schwere des Chloroformdampfes kleiner als 1 % des Totals, sodass sie vernachlässigt werden konnte. Nachdem alles Chloroform verdampft war, wurde dies gleichmässig über den Raum verteilt und die Objekte von oben ab, durch eine kleine, mit einem Kork verschlossene Öffnung, in die Glocke gebracht. Nach jeden zwei Versuchen wurde die Glocke stets aufs Neue gefüllt.

Die Ergebnisse waren:

Beta vulgaris. Zwei Versuche mit Schnitten aus zwei verschiedenen Wurzeln.

	Tension.	Letale Einwirkungszeit [1])
1er Versuch.	Gesättigt.	3′— 6′ = ± 4,5′
	$\frac{1}{2}$ ges.	10′— 16′ = ± 13′
	$\frac{1}{3}$ ges.	30′— 40′ = ± 35′
	$\frac{1}{4}$ ges.	60′— 70′ = ± 65′
	$\frac{1}{5}$ ges.	90′—120′ = ± 105′
2er Versuch.	gesättigt.	4′— 6′ = ± 5′
	$\frac{2}{3}$ ges.	7′— 10′ = ± 8,5′
	$\frac{1}{2}$ ges.	14′— 19′ = ± 16,5′
	$\frac{1}{3}$ ges.	35′— 45′ = ± 40′
	$\frac{1}{4}$ ges.	65′— 75′ = ± 70′

1) Stets sind die Grenzwerte einer grossen Zahl Beobachtungen angegeben und aus diesen der Mittelwert berechnet worden. Besonders bei *Beta* genügt schon eine so kleine Anthocyanquantität zur Beobachtung, dass praktisch der Anfang der Exosmose konstatiert wird.

Salix purpurea. Etiolierte Schösslinge. Beobachtung der zum Wasseraustritt erforderlichen Zeit.

gesättigt.	15′— 20′ = ± 17,5′
$\frac{2}{3}$ ges.	30′— 40′ = ± 35′
$\frac{1}{2}$ ges.	60′— 90′ = ± 75′
$\frac{1}{3}$ ges.	120′—180′ = ± 150′
$\frac{1}{4}$ ges.	unscharfe Reaktion.

Wolfgang Ostwald [1]) hat die Giftwirkung verschieden konzentrierten Meerwassers auf Gammarus Pulex studiert und dabei die Giftigkeit durch die empirische Gleichung $\frac{1}{t} = kc^p$ vorgestellt.

Darin ist t die Lebensdauer, welche durch das Gift je nach dessen Konzentration c verschieden stark verkürzt wird, also die letale Einwirkungszeit. k und p sind Konstanten.

Diese Giftigkeitsisotherme gibt als Exponentialvergleichung beim Logarithmieren die Gleichung einer Gerade.

$$\log \frac{1}{t} = \log k + p \log c.$$

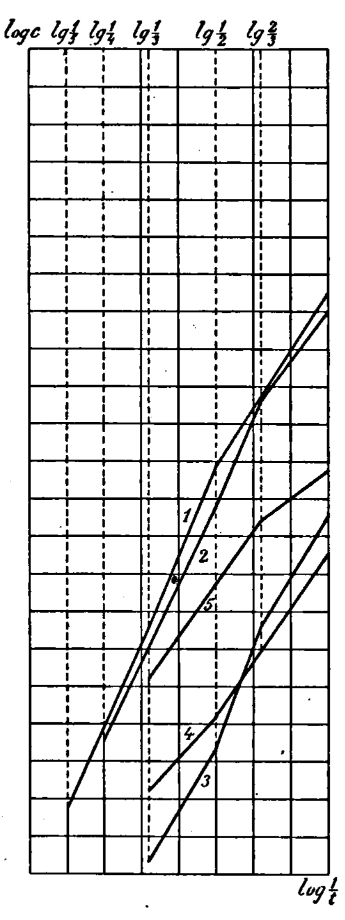
Trägt man deshalb bei einer graphischen Darstellung auf der Abszisse die Logarithme der Variablen c (Konzentration), auf der Ordinate die entsprechende Logarithme der Variablen $\frac{1}{t}$ ab, so erhält man eine gerade Linie.

Falls also bei unsren Versuchen der Vorgang wirklich der Giftigkeitsisotherme Ostwalds folgt, so muss sich bei der entsprechenden Darstellung eine gerade Linie ergeben. Die Konzentration dürfen wir den Dampftensionen gleichsetzen.

Dies trifft ziemlich gut zu (Vergl. die graphische Darstellung, besonders weil ich nur mit den Mittelwerten einiger Beobachtungen rechnen konnte; die Gleichung Ostwalds kann deshalb hier ebenfalls benutzt werden.

1) **Wolfgang Ostwald. Pflügers. Archiv 120. 1907.**

Der Exponent p ergibt sich aus der Gleichung $p = \frac{\log \frac{1}{t} - \log \frac{1}{t'}}{\log c - \log c'}$ und ist auch aus der graphischen Darstellung bequem zu ermitteln: p ist nl. der Tangens des Neigungswinkels der Gerade gegen die Abszisse, und für *Beta vulgaris* erhielt ich die Werte 1,90 und 1,96, für *Salix purpurea* 1,94 (1, 2, 3).



Wir können also sagen, dass die Schnelligkeit der letalen Prozesse annähernd dem Quadrate der Chloroformkonzentration proportional ist. Später komme ich auf die Diskussion dieses Resultats zurück, zuerst will ich jedoch hervorheben, dass, weil bei einer Temperatursteigerung von 10° C. die Dampftension und deshalb die Chloroformkonzentration im Verhältniss 1 bis 1,55 ansteigt, die Schnelligkeit der letalen Prozesse durch diesen Faktor $1{,}55^{1{,}96} = 2{,}36$ Mal grösser wird. [1])

Der Faktor der Tensionssteigerung der gesättigten Dämpfe reicht also fast zur Erklärung der sogenannten Temperatur koeffizienten bei

1) Oder $1{,}55^{1{,}90} = 2{,}30$ beim andern Versuch.

obigen letalen Prozessen aus, und die Frage muss noch beantwortet werden ob die Temperatur an und für sich überhaupt Einfluss auf die Schnelligkeit dieser Prozesse ausübte.

Zur Beantwortung dieser Frage verfuhr ich derart, dass ich die Einwirkung einer bestimmten Chloroformdampftension, bei Temperatur intervallen von 10° C. beobachtete. Das Objekt waren wiederum Schnitte aus dem Wurzelparenchym der *Beta vulgaris* und zwar von demselben Objekte des ersten Versuches S. 265 und des dritten Versuches S. 263. Die benutzte Tension war 50 mm., also brauchte ich zum Versuche bei 1° C. 704 mg., bei 10° C. 679 mg., bei 20° C. 606 mg. und bei 30° C. 634 mg. Chloroform.

Das Resultat war folgendes; die Temperaturkoeffizienten stehen in Klammern.

Temperatur.	Letale Einwirkungszeit.	
0° C.	65′—70′ = ± 67½′	
		[1,17]
10° C.	55′—60′ = ± 57½′	
		[1,10]
20° C.	50′—55′ = ± 52½′	
		[1,12]
30° C.	44′—50′ = ± 47′	

Der Mittelwert des wirklichen Temperaturkoeffizienten ist also 1,13 [1]) und dies stimmt gut mit dem Ergebnisse Seite 263 (3em Versuch). Denn das Produkt des wirklichen Koeffizienten und des Faktors 2,36, welcher der Tensionszunahme zu verdanken ist, muss den scheinbaren Temperaturkoeffizienten der Seite 263 geben.

Die Werte sind nl. 1,13 × 2,36 = 2,67 und 2,63.

Dieser niedrige Temperaturkoeffizient 1,13—1,21 deutet

1) Berechnet man den Koeffizienten auf gleiche Konzentration, so wird er $\left(1 + \frac{10}{273}\right)^{1,90}$ = 1,07 mal grösser, also 1,21.

sehr wahrscheinlich auf eine Diffusionsgeschwindigkeit hin und wir können deshalb sagen, dass dem Anschein nach eine Reaktion in einem heterogenen System vorliegt, bei welcher die Geschwindigkeit der eventuellen chemischen Reaktionen zu vernachlässigen ist, weil nur die langsamere Diffusionsgeschwindigkeit den ganzen Vorgang beherrscht. Wenn wir mit Gaidukow und Czapek [1]) die Plasmahaut, den Sitz der relativen Impermeabilität, als ein Emulsionskolloid, das heisst als eine äusserst feine Fett- oder Lipoidemulsion, welche zwischen den Lipoidtröpfchen Eiweisshydrosolen enthält, auffassen, so ist die Deutung dieser Diffusionsgeschwindigkeit leichter, als wenn wir, sowie Lepeschkin [2]) tut, uns denken, das sowohl Eiweiss als fettartige Körper im Dispersionsmittel vorkommen.

Bei letzterer Annahme lässt sich jedoch ebenfalls eine Vorstellung des Vorganges machen, eine Vorstellung, die ich hier nicht näher entwickeln will, weil zu wenig Tatsachen und zuviel Spekulation daran beteiligt sind und weil es meine Absicht ist, die letale Einwirkung anderer Giftstoffe bei variabler Temperatur und Konzentration zu studieren. Dann wird die Vergleichung der bei dieser Giftwirkung und bei der Chloroformeinwirkung sich ergebenden Konstanten, vielleicht geeignet sein neues Licht auf die noch so streitigen Fragen der Plasmahautzusammensetzung und Stoffaufnahme zu werfen.

Erst dann wird auch die Diskussion der Bedeutung des p-Wertes 1,90—1,96 fruchtbarer sein können. Jetzt kann

1) Czapek F. Über eine Methode zur direkten Bestimmung der Oberflächenspannung der Plasmahaut 1910.

Ruhland. Jahrb. f. wiss. Bot. denkt sich ebenfalls die chemischen Mittel, denen die reagierenden Stoffe vermöge des Dispersionsmittels zugeführt werden, an die der dispersen Phase entsprechenden Kolloide gebunden.

2) Lepeschkin W. W. Ber. d. d. bot. Ges. 1911.

man lediglich sagen, dass die Giftigkeitsisotherme $\frac{1}{n} = kc^p$ mit der Adsorptionsisotherme $\frac{x}{m} = kc^p$ [1]) grosse Übereinstimmung hat.

Bei den typischen Adsorptionsprozessen ist jedoch $\frac{1}{n} = p < 1$ und sowie Höber [2]) sagt, müssen wir bedenken, dass mit Exponentialformeln, wie beide Isotherme sind, sehr viele Vorgänge dargestellt werden können. z. B. die Massenwirkung und die Verteilung eines Stoffes auf zwei Lösungsmittel. Letzteres jedoch nur im Falle, dass der ins Lösungsmittel übergehende Stoff in einem anderen Molekularzustand vorhanden ist. Hier würde also der Chloroform zur Erklärung des p Wertes $\pm$ 2 in Doppelmolekülen auftreten müssen und mir wenigstens [3]) sind keine Beobachtungen, die dazu Veranlassung geben könnten, bekannt.

Die so verschiedenen Werte der Exponenten p, die bei den untersuchten Prozessen [4]) beobachtet wurden, sucht Höber l. c. dadurch zu erklären, dass der Vergiftungsmodus bei den genannten Prozessen ein so verschiedener ist.

1) x Quantität des adsorbierten, m des adsorbierenden Stoffes, c Konzentration des nicht adsorbierten Stoffes.

2) Höber R. Physikalische Chemie der Zellen und Gewebe 3e Aufl. 1911.

3) Vergl. Nernst. Theoret. Chemie und Handb. d. angew. physik-Chemie. Kuenen J. Verdampfung und Verflüssigung von Gemischen.

4) Für die Aufnahme von Chloroform durch Hefe fanden Herzog und Betzel (Zeitschr. f. physiol. Chem. 67, 1910) den Exponenten 1,4; bei der Hämolyse mit H_3N, Na_2Co_3 und NaOH fand O. Gros (Biochem. Zeitschr. 29, 1910) resp. 0,65, 0,71 und 1,30. Nach Beobachtungen von Paul, Birnstein und Reuss (Biochem. Zeitschr. 29, 1910) ist die Desinfektionsgeschwindigkeitskonstante, die den Verlauf der Abtötung der Staphylokokken vorstellt, bei wässeriger Salzsäure annähernd der Quadratwurzel, bei wässeriger n. Buttersäure annähernd dem Quadrate und bei wässeriger Essigsäure der Säurekonzentration selbst annähernd proportional.

Ich habe den Wert dieser Exponenten ebenfalls geprüft bei dem Prozesse der Farbstoffbildung, der soviel komplizierter ist als die letalen Prozesse, weil zuerst durch die letale Chloroformeinwirkung die relative Impermeabilität aufgehoben wird, dann die Stoffe diffundieren und die Oxydation des Chromogens so lange fortfahren muss bis der gebildete Farbstoff eben wahrnehmbar wird.

Die Objekte waren Blumenblätter der *Magnolia* und etiolierte Schösslinge von *Salix purpurea.* Die Versuche fanden bei 20° C. statt und die Methode war sowie oben beschrieben worden.

Magnolia	Tension.	Färbungszeit.
	gesättigt.	20″— 25″ = ± 22½″
	⅔ „	35″— 45″ = ± 40″
	½ „	55″— 65″ = ± 60″
	⅓ „	90″—100″ = ± 95″
	¼ „	unscharfe Reaktion.

p = ± 1,27. (Siehe graphische Darstellung 4).

Salix purpurea	Tension.	Färbungszeit.
	gesättigt.	2′—2½′ = ± 135″
	⅔ „	2½′—3½′ = ± 180″
	½ „	4′—5′ = ± 270″
	⅓ „	7′—9′ = ± 480″
	¼ „	Reaktion unscharf.

p = 1,15. (Siehe graphische Darstellung 5, die Abszisse ist hier höher zu denken).

Die p-Werte sind hier also viel kleiner als bei der letalen Einwirkungszeit, die Temperaturkoeffizienten jedoch viel grösser. Die zur Konstatierung dieser Werte befolgten Methoden waren dieselben wie oben. Die Temperaturkoeffizienten stehen in Klammern. Tension 60 mm.

Magnolia (Blumenblätter).

Temperatur.	Färbungszeit.	
0° C.	3½′—4′ = ± 225″	
10° C.	2′—2½′ = ± 135″	[1,7]
20° C.	1½′—2′ = ± 105″	[1,3]
30° C.	1′—1½′ = ± 75″	[1,4]

Der Mittelwert ist 1,44.

Salix purpurea. (Etiolierte Schösslinge).

Temperatur.	Färbungszeit.	
0° C.	13′—15′ = ± 14′	
10° C.	8′— 9′ = ± 8½′	[1,6]
20° C.	6′— 7′ = ± 6½′	[1,3]
30° C.	4′— 5′ = ± 5½′	[1,5]

Der Mittelwert ist 1,46. [1])

Sowie oben können wir zur Kontrolle aus dem Produkte des wirklichen Koeffizienten und des Factors, welcher der Tensionszunahme zu verdanken ist, den scheinbaren Temperaturkoeffizient berechnen, und diesen Wert mit dem gefundenen S. Seite 262 und 263 vergleichen.

Für *Magnolia* $1{,}55^{1{,}27} \times 1{,}44 = 2{,}51$ und 2,62.

Für *Salix purpurea* $1{,}55^{1{,}15} \times 1{,}46 = 2{,}42$ und 2,32.

Wir sehen also dass die Konstanten dieser so viel komplizierteren Prozesse von denen der letalen Prozesse völlig verschieden sind. Die grösseren Temperaturkoeffizienten sind leicht zu verstehen, weil der letzte, die grösste Zeit in Anspruch nehmende, Teil des komplizierten Prozesses eine Enzymreaktion, die bekanntlich oft einer Koeffizient von ± 2 hat, ist.

---

1) Bei niedriger Temperatur 0°—10° C. sind die Koeffizienten am grössten.

§ 4. Das Vorkommen von Catechol und andern Chromogenen bei den höheren Pflanzen.

Die Betrachtungen Beyerincks in Bezug auf die Nekrobiose wurden veranlasst durch seine Untersuchungen über die Indigobildung aus *Isatis tinctoria* L., in welcher Pflanze das Chromogen Isatan gespaltet wird, sodass Indoxyl entsteht: [1]) die Chromogene der meisten andren Pflanzen waren ihm noch unbekannt. Später konnte ich nachweisen, dass bei *Salix* und *Populus* Spec. [2]) Catechol (Pyrocatechin), bei *Vaccinium vitis idaea* L. und *Pirus communis* L., [3]) Hydrochinon die Chromogene sind.

Für die *Dipsaceae* erkannte Frl. Tammes [4]) in Dipsacan das Chromogen, für *Aucuba japonica* Thb. fanden Bourquelot und Herissey [5]) es in Aucubigenin und zahlreiche Arbeiten ergaben, dass Tyrosin ebenfalls als Chromogen auftreten kann. Die Spaltung des Indikans, Isatans und Dipsacans liefert blaue, die des Catechols, Hydrochinons, Aucubigenins und Tyrosins schwarze Produkte, es lag deshalb auf der Hand einige beim Absterben sich schwarz färbenden Pflanzen, wie *Monotropa hypopitys* L., *Melampyrum pratense* L., *Sarothamnus vulgaris* Wimm auf Catechol zu prüfen, ich bekam jedoch stets ein negatives Resultat. [6])

1) Die meisten sich bei Nekrobiose blau färbenden Pflanzen enthalten dagegen das Indikan. Vergl. Beyerinck, Med. Kon. Ak. v. Wet. A'dam 1899 und 1900 und Czapek, Biochemie der Pflanzen II 48[es] Kapitel.

2) Weevers Th. Jahrb. f. wiss. Bot. 1903.

3) Weevers Th. Rec. d. Trav. bot. 1910.

4) Tammes T. Rec. d. Trav. bot. 1908.

5) Bourquelot und Herissey. Ann. Chim. Phys. 8[me] Serie t. IV.

6) Ebensowenig fand ich Catechol bei den Catechin liefernden Pflanzen *Uncaria Gambir* Roxb., *Ac. catechu* Willd, *Pterocarpus* Spec.. Es fehlte auch bei *Ampelopsis quinquefolia* R. et Sch., *Pirus Malus* L, *Cydonia japonica* Pers., *Rubus Idaeus* L., *Picea excelsa* Link., *Magnolia* (Blumenblätter), welche sich beim Absterben braun färben.

Es wunderte mich deshalb sehr, als in einer neulich erschienenen Arbeit von M. Wheldale, [1]) die Anwesenheit des Catechols für zahlreiche Pflanzen aus sehr verschiedenen Familien angegeben wurde.

Miss Wheldale behauptet, dass alle Pflanzen, welche die direkte Guajakreaktion geben, ebenfalls die Fähigkeit besitzen in Chloroformdampf oder bei mechanischer Verletzung, also bei Nekrobiose, ein braunes oder rotbraunes Pigment zu bilden. Die Pflanzen, welche diese Eigenschaft haben, *Compositae, Umbelliferae, Labiatae, Boraginaceae* u. a. sollen Catechol enthalten.

Ich habe diese Angaben nachgeprüft und kann sie durchaus nicht bestätigen, eine fehlerhafte Methode hat das falsche Resultat verursacht.

Ihr Verfahren beschreibt Miss Wheldale mit folgenden Worten: „The alcoholic extract of the plants is evaporated to dryness and the pyrocatechin extracted with ether or acetone after removal of chlorophyll and other substances soluble in chloroform." Der eingedampfte Alkoholauszug wird also m. E. zunächst mit Chloroform ausgezogen und später im Ätherextrakt des Restes, der in Cloroform unlöslich war, das sogenannte Catechol nachgewiesen. Weil jedoch Catechol ganz gut in Chloroform löslich ist, würde es, wenn anwesend, schon von Chloroform ausgezogen und nicht im Ätherextrakt zu finden sein. Der Stoff, der darin nachgewiesen wurde, ist also kein Catechol, wie ich unten weiter dartun will.

Dieser Nachweis beruht auf der bekannten Eigenschaft einer Catechollösung sich mit einer Spur $FeCl_3$ grün zu färben, welche Farbe durch Hinzufügung von verdünnter Na_2CO_3lösung schön purperrot wird. Protokatechusäure gibt dieselbe Reaktion, ebenfalls Kaffeesäure sowie alle

1) Wheldale M. Proc. roy. soc. Serie B Vol 84 1911.

Derivate mit dem Protokatechusäurerest $(OH)_2\ C_6\ H_3\ C.$ [1])

Im obengenannten Ätherextrakt bekommt Miss Wheldale nun eine Farbereaktion, die mit der soeben beschriebenen ziemlich genau übereinstimmt, ein Beweis für die Anwesenheit des Catechols (die Protokatechusäure und Derivate lässt Miss Wheldale hier ausser Betracht) ist dies freilich nicht, wie aus Folgendem hervorgeht.

In meiner ersten Arbeit über die Glykoside beschrieb ich wie man Catechol durch Sublimation vorzüglich nachweisen kann. Natürlich muss man sich dann davon überzeugen, dass das Catechol nicht ein pyrochemisches, durch Spaltung irgend eines Gerbstoffes, gebildetes Produkt ist, wie auch in meiner Arbeit durch Nachweis der, mittelst ihrer physischen Konstanten identifizierbaren Catecholkrystalle, im Reste des Ätherextraktes unzweideutig möglich war.

Ich habe daher bei denselben Objekten, [2]) die Miss Wheldale untersuchte, den Ätherextrakt, nachdem die Extrahierung mit Chloroform vermieden war, auf Catechol geprüft. Vom Alkoholauszug, der natürlich Wasser aus den Geweben enthielt, wurde der Alkohol abgedampft und der wässerige Rest mit Äther ausgeschüttelt. Der Ätherextrakt gab keinen Catecholbeschlag, wie aus dem Fehlen der Reaktion mit $FeCl_3$ und Na_2CO_3 hervorging; fügte ich zu dem Alkoholextrakt etwas Catechol $\pm$ 0,2 mg. so war das Resultat positiv, ein Beweis also, dass eventuell vorhandenes Catechol nachzuweisen gewesen wäre.

Kochte ich den alkoholischen Extrakt der Pflanzenteile mit HCl und verfuhr weiter wie oben, so war ebensowenig Catechol nachzuweisen, es lag ebensowenig ein Catechol abspaltendes Glykosid vor.

1) Tiemann F. Ber. d.d. chem. Ges. 14. 958.

2) *Prunus laurocerasus* L., *Ligustrum vulgare* L. und *Mahonia aquifolium* Nutt.

Nach Grafe [1]) soll wahrscheinlich das Catechol verantwortlich sein für die Dunkelfärbung des Rübensaftes, ich konnte dies nicht bestätigen, weder die jungen Schösslinge noch die Wurzeln von *Beta* (Zückerrübe [2]) und Viehrübe) lieferten Catechol.

Das Catechol war deshalb mit Ausnahme von *Salix* und *Populus* spec. bei den untersuchten Objekten, die aus sehr verschiedenen Familien herkamen, niemals nachzuweisen und ich bin vorläufig der Meinung, dass sein Vorkommen sich auf die *Salicaceae* beschränkt. Man kann hier jedoch nicht so weit gehen, wie Frl. Tammes es in Bezug auf das Dipsacan für die *Dipsaceae* getan had und sagen, dass ein Zusammenhang besteht zwischen dem Vorkommen des Catechols und dem Vorhandensein des charakteristischen Merkmalkomplexes der *Salicaceae*, denn z. B. in *Salix babylonica* L., konnte ich noch kein Catechol nachweisen.

Welche Stoffe im Ätherextrakt die obengenannte Farbenreaktion mit $FeCl_3$ und $Na_2\ Co_3$ geben, kann ich nicht entscheiden, es braucht auch durchaus nicht bei allen Objekten derselbe Stoff oder dieselbe Stoffe zu sein. Protokatechusäure oder Kaffeesäure ist es wenigstens bei *Prunus laurocerasus* L., *Ligustrum vulgare* L. und *Mahonia aquifolium* Nutt nicht, denn sonst würde, weil diese Säuren beim Erhitzen über 200° C. Catechol abspalten, der bei höherer Temperatur erhaltene Beschlag die Catechol Reaktion gezeigt haben.

1) Grafe V. Öst. ung. Zeitschr. für Zuckerindustrie 1908.
v. Lippman (Ber. d. d. Chem. Ges. 1887) fand im Mutterlauge des aus *Beta* erhaltenen Rohrzuckers Pyrocatechin, es war jedoch nicht sicher ob es aus der Rübe stammte oder bei der Fabrikation gebildet war. Für gelbe Rübenblätter gibt L. ebenfalls das Vorkommen an. Es ist jedoch möglich, dass hier sowie bei *Ampelopsis* Blättern Pyrocatechin mit der Kaffeesäure oder Hydrokaffeesäure verwechselt worden ist.

2) Die Rüben erhielt ich von der Firma Kühn Naarden.

Für Chlorogensäure ($C_{32}H_{38}O_{19}$), die zufolge ihrer $(OH)_2$ C_6H_3C gruppe dieselbe Reaktion mit $FeCl_3$ und Na_2CO_3 gibt, hat neulich K. Gorter[1]) eine charakteristische Reaktion publiziert und ich habe deshalb die drei obengenannten Pflanzen (*Prunus laurocerasus*, *Ligustrum vulgare* und *Mahonia aquifolium*), deren Ätherextrakt die genannte Farbenreaktion mit $FeCl_3$ und Na_2CO_3 gab, auf diese Säure geprüft und erhielt bei dem letzten Objekte ein positives, bei den andern ein negatives Resultat. Nach den Angaben Gorters ist die Chlorogensäure jedoch in Äther unlöslich, in den Ätherextrakt kann also die Säure falls sie in der Pflanze war, dennoch nicht übergehen und nicht die Ursache der Farbenreaktion sein.

Wir wissen nicht einmal ob die Reaktion von einem Stoffe oder von einem Gemisch mehrerer Stoffe herrührt. z. B. gibt eine Mischung von Quercitrin und Gallussäure, Stoffe die weniger als Catechol in $CHCl_3$ löslich sind, mit $FeCl_3$ unn Na_2CO_3 ähnliche Färbungen. Ob dieser mit $FeCl_3$ sich färbende Stoff derjenige ist, der bei der Nekrobiose durch die Oxydase derart oxydiert wird, dass braune Produkte sich bilden ist ebenfalls noch die Frage. Bei den Blumenblättern von *Magnolia precia* Cor. (*Magnolia* Yulan. Desf.)[2]) habe ich dies etwas näher geprüft.

Die Blumenblätter wurden in kochendem Alkohol getötet, vom Extrakt der Alkohol grössenteils abdestilliert, ein wenig Wasser hinzugefügt und die Lösung mit Äther ausgeschüttelt. Der wässerige Rest zeigte nach dem Ausschütteln eine viel stärkere Reaktion mit $FeCl_3$ als der Rest der Ätherextraktes. Die etwas gelbliche wässerige Flüssigkeit wurde durch eine Spur $FeCl_3$ grün gefärbt,

---

1) Gorter K.. Bullet. du Dep. de l'Agricult. des Indes neerl. 1907. Ann. du Jard. bot. Buitenzorg 1909.

2) Dr. A. Pulle war so freundlich diese Spezies für mich zu bestimmen.

welche Färbung sich durch eine Spur Na_2CO_3 in braunrot ändert. Nach dem Einengen scheiden sich gelbliche Kristalle aus der Flüssigkeit ab und durch zweimal Umkristallisieren aus heissem Wasser, das sie ganz gut löst, wurden diese gereinigt. (Die Krystalle färben sich bei 172° braun, und bei 184° wird die Masse karamelartig, ein scharfes Schmelzpunkt war nicht zu beobachten). Kristallform gelbliche, polarisierende Nadeln, welche besonders geneigt sind, sich unter sehr spitzen Winkeln pinselförmig zu verzweigen.

Dieser Stoff gibt dieselbe Farbenreaktionen mit $FeCl_3$ und Na_2CO_3, wird durch eine Spur KoH rotgelb gefärbt, reagiert fast nicht mit einer konzentrierten Kaliumbichromatlösung, reduziert eine Silbernitratlösung fast sofort in der Kälte, reduziert sogar beim Kochen die Fehlingsche Lösung nicht.

Durch Emulsin wird der Körper nicht gespaltet, nach Kochen mit verdünnter Salzsäure scheiden sich beim Abkühlen gelbe Kristallnadeln ab und das wasserhelle, farblose Filtrat reduziert beim Kochen die Fehlingsche Lösung. Mit Koffein, Salzsäurechinin und Eiweisslösungen erhielt ich keine Reaktionen, dies deutet also nicht auf einen Gerbstoffcharakter hin. Die Färbung mit $FeCl_3$ deutet auf ein Protokatechusäurederivat.

Vielleicht liegt also ein Glykosid vor, ich konnte jedoch kein Osazon bekommen. Der durch Kochen mit HCl erhaltene Spaltungsprodukt kristallisiert in gelben, zu Garben vereinigten, schön polarisierenden Nadeln, mit deren Untersuchung ich weiter beschäftigt bin. [1])

Dieser Stoff, der also die obengenannte Farbenreaktion

1) Der Spaltungsprodukt ist fast unlöslich in kaltem Wasser und Äther, ziemlich gut löslich in heissem Wasser und Alkohol. Bei ± 200° C. färbt die Stoff sich braun, schmilzt und wird zersetzt. Der Spaltungsprodukt zeigt einige Übereinstimmung mit dem Vinylbrenzcatechin, wofür Kunz Krause, Berl. B. 30 einige Reaktionen gegeben hat, z. B. stimmt die Reaktion mit H_2SO_4 überein, nicht diejenige mit Bromwasser.

mit $FeCl_3$ und Na_2CO_3 gibt, wird jedoch durch ein aus den *Magnolia* Blumenblättern dargestelltes Oxydasepräparat, das den wässerigen Blumenblätterextrakt deutlich braun färbt, gar nicht verändert, ist also das gesuchte Chromogen nicht.

§ 5. Zusammenfassung.

Die Resultate können folgendermassen kurz zusammengefasst werden.

Bei den Phanerogamen kommen sehr verschiedene Chromogene vor, nur bei den *Salicaceae* ist Catechol der Mutterstoff des schwarzen Pigmentes.

Bei Chloroformeinwirkung erfolgt diese Pigmentbildung, sowie die Produktion aromatischer Stoffe und ätherischer Öle, nur bei Nekrobiose, wenn die Gewebe getötet, die Enzyme unzerstört sind. Nicht eine mehr intensive Enzymwirkung unterm Einfluss des Anästhetikums, sondern eine nur beim Zellentode auftretende, völlige Permeabilität der Hautschicht des Protoplasmas, ist die Veranlassung zu diesen Prozessen.

Die letale Einwirkungszeit für gesättigten Chloroformdampf ist bei 11—12° C. für empfindliche Objekte wie Keimwurzeln von *Triticum vulgaris* Vill und *Pisum sativum* L., für etiolierte Schösslinge von *Salix purpurea* L. *Solanum tuberosum* L., Parenchymgewebe der Rübe 15—60 Sekunden; für die Epidermis der *Magnolia*-Blumenblätter sogar $<$ 5 Sekunden; für weniger empfindliche Objekte wie die erwachsenen Blätter von *Aucuba japonica* Thb. und *Prunus laurocerasus* L. 1—2 Minuten. Die Zeit ist sehr vom Wasserreichtum der Gewebe abhängig, lufttrockne Samen von *Pisum sativum* und *Triticum vulgare* haben nach einer Einwirkungszeit von mehr als 240 Stunden ihre Keimkraft nicht eingebüsst.

Die Giftwirkung verschieden konzentrierter Chloroform-

dämpfe kann bei einer selben Temperatur für etiolierte Schösslinge von *Salix purpurea* und Wurzelparenchym von *Beta vulgaris* durch die von Wo. Ostwald benutzte Giftigkeitsisotherme $\frac{1}{t} = kc^p$ vorgestellt werden. Die Werte für p liegen zwischen 1,90 und 1,96; es ist also bei der Grösse dieses Wertes fraglich, ob der Vorgang als ein Adsorptionsprozess betrachtet werden kann.

Wir können sagen, dass die letale Einwirkungszeit der Schnelligkeit der Prozesse, die den Tod verursachen, umgekehrt proportional, und die Schnelligkeit dieser letalen Prozesse deshalb annäherend dem Quadrate des Chloroformdampftension proportional ist.

Der wirkliche Temperaturkoeffizient dieser letalen Prozesse liegt zwischen 1,13 und 1,21, welche Tatsache sehr wahrscheinlich auf eine Diffusionsgeschwindigkeit hindeutet. Wir können deshalb sagen, dass dem Anschein nach eine Reaktion in einem heterogenen System vorliegt, bei welcher die Geschwindigkeit der eventuellen chemischen Reaktionen zu vernachlässigen ist, weil nur der langsamere Diffusionsvorgang den Prozess beherrscht.

Mit der Auffassung der, die relative Impermeabilität des lebenden Protoplasten regulierende, Hautschicht als ein Emulsionskolloid lässt sich dies ganz gut vereinbaren. Fasst man die soviel komplizierteren Prozesse der bei Nekrobiose auftretenden Braun- und Schwarzfärbung bei *Magnolia*-Blumenblättern und etiolierten *Salix*-Schösslingen als ein Ganzes auf, so findet man für p viel kleinere (resp. 1,27 und 1,15), für die Temperaturkoeffizienten grössere Werte $\pm$ 1,5. Der letzte und zeitlich längere Teil dieser komplizierten Prozesse ist nl. ein enzymatischer, bei welchen Prozessen bekanntlich im Allgemeinen grössere Temperaturkoeffizienten beobachtet werden.

Amersfoort, März 1912.